

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Tereza Vejvodová

STUDIUM INTERAKCE MEZI BOREM A VYBRANÝMI CUKRY

Study of Boron-Carbohydrates Interaction

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Konzultant: RNDr. Martin Štícha, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. srpna 2018.

Podpis

Abstrakt

Interakce boru s cukry je důležitá pro pochopení úlohy boru jakožto přenašeče pro nukleotidy a karbohydráty. Arylboronové kyseliny mají také široké uplatnění jako cukerné senzory, jelikož jsou to malé a flexibilní molekuly. Komplexy boru hrají klíčovou roli u borové neutronové zachytové terapie. Tato radiochemoterapie je významná při léčbě melanomů, maligních gliomů a jiných druhů rakoviny. V této práci byly připraveny komplexy boru s kyselinou askorbovou a glukosou, které byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokou rozlišovací schopností (HRMS). Připravené komplexy byly studovány pomocí kolizí indukované disociace (CID), což vedlo k objasnění mechanismu jejich fragmentace.

Klíčová slova

Komplexy boru, kyselina askorbová, glukosa, sacharidy, hmotnostní spektrometrie, ionizace elektrosprejem, ESI-MS, kolizí indukovaná disociace, CID

Abstract

The interaction between boron and sugars is significant for understanding the role of boron as a carrier for nucleotides and carbohydrates. Arylboronic acids also have wide application as sugars sensors because they are small and flexible molecules. Boron complexes play a key role in boron neutron capture therapy. This radiotherapy is important in the treatment of melanoma, glioblastoma multiforme and other types of cancer. Boron complexes with ascorbic acid and glucose were prepared in this thesis and then characterized by high-resolution mass spectrometry (HRMS). Synthesised complexes were studied using collision-induced dissociation (CID), which led to the clarification of their fragmentation mechanism.

Key Words

Boron complexes, ascorbic acid, glucose, carbohydrates, mass spectrometry, electrospray ionization, ESI-MS, collision-induced dissociation

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. a RNDr. Martinu Štíchovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, trpělivost, vstřícnost, cenné rady a připomínky během teoretického i experimentálního vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala svojí rodině za podporu během celého studia.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	6
1 Cíl práce	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Kyselina boritá.....	8
2.1.1 Způsoby detekce boru ve vzorcích	9
2.1.2 Komplexy boru a jejich vznik	10
2.1.2.1 Komplexy boru s kyselinou askorbovou	10
2.1.2.2 Komplexy boru se sacharidy.....	10
2.1.3 Význam a využití komplexů boru	12
2.1.3.1 Borová neutronová záchytová terapie.....	12
2.1.3.2 Ostatní	12
2.2 Kyselina askorbová.....	13
2.3 Glukosa	13
2.4 Hmotnostní spektrometrie.....	14
2.4.1 Ionizace elektrosprejem.....	14
2.4.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie	15
3 Experimentální část.....	17
3.1 Seznam chemikálií	17
3.2 Přístroje a software	17
3.3 Postup.....	18
3.4 Podmínky měření	18
4 Výsledky a diskuze.....	20
4.1 Komplex $[B(AA)_2]^-$	21
4.2 Komplex $[B(AA)_4]^-$	24
4.3 Komplex $[B(Glu)_2]^-$	26
.....	27
5 Závěr.....	29
Seznam použité literatury	30

Seznam zkratek a symbolů

AA	kyselina askorbová, (Ascorbic Acid)
AAS	atomová absorpční spektroskopie, (Atomic Absorption Spectroscopy)
AES	atomová emisní spektroskopie, (Atomic Emission Spectroscopy)
B-FITC	konjugát fluoresceinisothiokyanátu s borem, (Fluoresceinisothiocyanate Boronic-Acid Conjugate)
BNCT	borová neutronová záchytová terapie, (Boron Neutron Capture Therapy)
BPA	L- <i>p</i> -borofenylalanin, (L- <i>p</i> -Boronphenylalanine)
BSH	borokaptát sodný, (Sodium Borocaptate)
CID	kolizí indukovaná disociace, (Collision-Induced Dissociation)
ESI	ionizace elektrosprejem, (Electrospray Ionization)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokou rozlišovací schopností, (High Resolution Mass Spectrometry)
ICP-OES	emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
MAS NMR	nukleární magnetická rezonance s rotací vzorku pod magickým úhlem, (Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie, (Tandem Mass Spectrometry)
m/z	poměr hmotnosti k náboji
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid, (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)
QTOF MS	hybridní hmotnostní spektrometrie, (Quadrupole Time-Of-Flight Spectrometry)
RNA	ribonukleová kyselina, (Ribonucleic Acid)

1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je příprava komplexů boru s vybranými cukernými ligandy (polyoly) jako jsou kyselina askorbová a glukosa a jejich následná charakterizace pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS).

2 Teoretická část

Biochemická úloha boru v lidském i zvířecím organismu není doposud objasněna, přestože je více jak 80 let znám jeho význam u vyšších rostlin (esenciální prvek pro jejich správný růst) ^{1,2}. V současné době je přijímána teorie, která popisuje propojování biologických molekul esterovými vazbami přes atom boru, což zvyšuje stabilitu molekul ².

Některé studie navrhuji zapojení boru do tří významných procesů: udržení struktury buněčné stěny, podpora metabolismu a zachování správné funkce membrány ¹. Borové minerály pravděpodobně hrály zásadní roli u stabilizace cyklické ribosy během její syntézy v prebiotickém RNA světě ³. Tuto domněnku potvrzuje i prokázaná nenahraditelnost boru u specifických druhů bakterií, např. heterocystních cyanobakterií ⁴ a aktinomycet rodu *Frankia* ⁵. Cyanobakterie vyžadují bor pro vytvoření stabilní schránky, která zabraňuje přístupu kyslíku k proteinovému komplexu nitrogenasy během fáze fixace dusíku. Bor vytvoří komplex s hydroxylovými skupinami glykolipidů na vnitřní membráně, čímž dojde ke zpevnění schránky ^{1,4}. U aktinomycet má bor význam při podpoře růstu i během fixace dusíku ⁵.

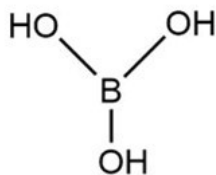
V periodické tabulce prvků bor zaujímá speciální místo, nachází se ve stejné periodě jako uhlík, ale má pouze o jeden elektron méně. Najdeme zde proto velké množství podobných vlastností, které jej činí zajímavým a užitečným ve světě uhlíku organické i medicínské chemie ⁶.

2.1 Kyselina boritá

V intracelulárním pH existuje majoritní množství boru právě ve formě kyseliny borité. Za těchto podmínek podléhá chování Lewisových kyselin a tvoří adiční sloučeniny s aminokyselinami a hydroxykyselinami, karbohydráty, nukleotidy a vitaminy přes donor-akceptorní interakce ^{2,7}.

Struktura kyseliny borité je znázorněna na obrázku 1. Připravuje se smísením roztoku silné kyseliny (sírové nebo chlorovodíkové) s roztokem tetraboritanu sodného ⁸. Čistá kyselina se nachází ve formě bílých šupinkovitých krystalků a je bez zápachu. Její rozpustnost se výrazně zvyšuje se vzrůstající teplotou a kyselost jejích roztoků se zvyšuje přidávkou polyolů (organických sloučenin s větším počtem -OH skupin). Má antiseptické, antifungální a antivirové vlastnosti ^{8,9}. Jedním z jejích

nejporozuhodnějších rysů ovšem zůstává snadné připojení a odstranění diolů, což naskytuje potenciál v jejich recyklaci ¹⁰.



Obrázek 1: Struktura kyseliny borité

2.1.1 Způsoby detekce boru ve vzorcích

Vývoj metod pro identifikaci borových ligandů v biologických vzorcích je velmi významný. V minulosti již bylo využito kapilární elektroforézy pro detekci a kvantifikaci a porovnání *in vitro* boru navázaného s adenyláty a nikotinamidy. Z přirozeně se vyskytujících molekul u zvířecích organismů má největší afinitu k vazbě s borem právě nikotinamidadenin dinukleotid (NAD⁺) ¹¹.

Přínosem v mapování míst v buňce, kam se váže bor, by bylo zdokonalení specifických markerů, které by se připojily k cis-diolovým skupinám. Využívá se konjugát fluoresceinisothiokyanátu s borem (B-FITC) nebo imuno značení pomocí anti-FITC protilátek. Další způsobem pro identifikaci bor-vázajících míst je využití elektronové mikroskopie. Tyto techniky znázorňující kapacitu borát-vázajících míst vyžadují umělé obohacení buď borátem, nebo specifickými markery, které se k danému místu váží. Bohužel neumožňují identifikaci diesterových komplexů boru a nejsou vhodné pro detekci *in vivo* ¹.

Bor se ve své přirozené formě vyskytuje ve formě směsi dvou izotopů ¹⁰B a ¹¹B v poměru 2:8. Nepřítomnost radioaktivního izotopu boru značně ztěžuje značení borových komplexů, a proto vývoj techniky, která dokáže zachytit rozdíl mezi oběma izotopy je nejužitečnejším řešením ¹.

Existuje řada technik v materiálové vědě pro analýzu jednotlivých izotopů, ale málo z nich má citlivost pro stopovou detekci. Mezi nukleárními technikami se ukázala být účinným nástrojem ¹¹B NMR. Naopak ¹⁰B NMR se běžně nepoužívá kvůli nižší citlivosti a vyššímu kvadrupólovému momentu ^{12,13}. Velmi cennou pomůckou pro identifikaci sloučenin obsahujících bor je právě i hmotnostní spektrometrie, která umožňuje rozlišení dvou borových izotopů. Tím vzniká pro bor velmi charakteristické hmotnostní spektrum, které je odlišné od ostatních sloučenin a je poměrně snadné jej identifikovat ¹⁴. Dalším

praktickým nástrojem je γ -spektrometrie, která dokáže stanovit bor v neporušených vzorcích. Tato vlastnost činí γ -spektrometrii velmi užitečnou v lékařských aplikacích zahrnujících borovou neutronovou zachytovou terapii (BNCT). Aplikace atomové absorpční (AAS) a atomové emisní spektroskopie (AES) je značně omezená v důsledku nízké citlivosti a přesnosti metod ¹⁵. Emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) přinesla značné vylepšení v analýze boru díky svojí jednoduchosti, citlivosti a schopnosti detekce více prvků. V porovnání s iontovou chromatografií, taktéž využívanou ke stanovení boru, má ICP-OES vyšší citlivost ^{15,16}.

2.1.2 Komplexy boru a jejich vznik

2.1.2.1 Komplexy boru s kyselinou askorbovou

Trigonální borové kyseliny RB(OH)_2 a jejich čtyřvazná konjugovaná báze RB(OH)_3^- mohou podléhat vzniku komplexů v přítomnosti bidentátního ligandu ¹⁷.

U mono a bis(askorbátoborátových) komplexů je známo, že chelatace probíhá právě přes výše zmíněné *cis*-enediolové skupiny kyseliny, bez zapojení postranních -OH skupin. Tyto anionické komplexy jsou stabilizovány pomocí kationtů alkalických solí, např. Li^+ , Na^+ a Ca^{2+} . Ve formě solí byly cheláty izolovány z vodných roztoků a následně charakterizovány pomocí různých technik jako jsou FTIR, ^{13}C a ^{11}B MAS NMR, což potvrdilo předpoklady o navázání atomu boru přes *cis*-enediolové skupiny kyseliny ^{2,18}. Bylo experimentálně zjištěno, že bis-chelátové komplexy mají mnohem vyšší teplotní a hydrolytickou stabilitu než jejich monochelátová obdoba. Jsou skoro nedisociovatelné ve vodném prostředí. Neutralizace esterových komplexů pomocí kationtů kovů napomáhá stabilizaci struktury ^{2,19}.

Vlastní komplexace probíhá přes sled esterifikačních reakcí. Částečná esterifikace dává vzniku monoesteru (v poměru 1:1), který je buď planární a nenabíjí, nebo tetraedrální se záporným nábojem. Při kompletní esterifikaci se tvoří bischelátový komplex (v poměru 1:2) se záporně nabitým atomem boru a tetraedrální konfigurací. Chování komplexů, především pomalá hydrolyza jejich solí, definuje jejich potenciál v nutričních a farmaceutických aplikacích ².

2.1.2.2 Komplexy boru se sacharidy

Syntéza borových komplexů s cukry může probíhat dvěma způsoby. Přímoou kondenzací cukru s boronovou kyselinou. Kyselina snadno kondenzuje sama se sebou, a vytváří tak

cyklické anhydridy. Reakcí s vhodnými dioly pak vznikají cyklické boronáty. Dalším způsobem je příprava z borinátů. Výhodou je, že při reakci nevzniká voda jako vedlejší produkt.

Je pravděpodobné, že existuje zásadní rozdíl mezi těmito komplexy připravenými dvěma různými způsoby. V prvním případě, během podmínek dehydratace, esterifikace může být zvrtná. V druhém případě při vzniku komplexů z borinátů ovšem není ²⁰.

Bylo zjištěno, že komplex sodné soli *L-p*-borofenylalaninu (*L-p*-BPA) a fruktosy (v poměru ligand:centrální ion 1:1) lze izolovat bez chloridu sodného a následně rehydratovat. Tato „salt-free“ metoda může nabídnout klinicky významné výhody a je vhodná i pro koncentrovanější roztoky. Obecně pro komplexy vzniklé chelatací *L-p*-BPA se sacharidy je pětičlenný kruh (furanosa) preferován před jeho šestičlennou obdobou (pyranosou). Stabilita borátových komplexů je závislá na typu diolu (1,2-diol nebo 1,3-diol). Pokud diol obsahuje hydroxylové skupiny vhodně orientované tak, aby odpovídaly strukturním parametrům tetraedrálně koordinovaného boru, dojde k vytvoření velmi silného komplexu ^{21,22}.

Stabilita borových komplexů je závislá na velikosti kruhu cukru, uhlíkových radikálech a na přítomnosti a typu skupin substituovaných na esterovém kruhu v molekule ²⁰.

Pro strukturní popis komplexů je obvykle nutné zahrnout substituci neesterifikovaných hydroxylových skupin a následně charakterizovat vzniklé produkty. Mezi velmi užitečné fyzikální metody analýzy se řadí difrakce rentgenového záření, nukleární magnetická rezonance (NMR) a právě hmotnostní spektrometrie (MS) ²⁰. Jako účinný nástroj pro detekci interakcí boru s cukry slouží také optické metody (fluorescence a cirkulární dichroismus) ²³.

Chelatace s cukry je významná pro pochopení úlohy boru jakožto přenašeče pro nukleotidy a karbohydráty ². Analýza sacharidů obecně má velmi významný dopad v potravinářském průmyslu, klinické diagnóze, biologických a průmyslových aplikacích ²⁴.

2.1.3 Význam a využití komplexů boru

2.1.3.1 Borová neutronová záchytová terapie

Borová neutronová záchytová terapie (BNCT) je druh radiochemoterapie velmi významné při léčbě maligních gliomů, melanomů a jiných druhů rakoviny. Poprvé bylo navrženo využití sloučenin boru pro neutronovou záchytovou terapii již v roce 1936 a klinické testování probíhalo o necelých dvacet let později ^{6,25}.

Prvním kritickým předpokladem pro úspěšné využití BNCT je cílené doručení boru k nádoru. K těmto účelům slouží speciálně vyvinuté sloučeniny, z nichž dvě v klinické praxi nejpoužívanější jsou merkaptoundekahydrododekaborát (BSH) a *p*-borofenylalanin (BPA) ^{21,25,26}. Dokud se nepodaří syntetizovat nové sloučeniny, které by efektivněji doručovaly bor na místo určení, je třeba vkládat úsilí do zlepšení dávkování a dopravování BPA a BSH ke karcinomu ²⁶.

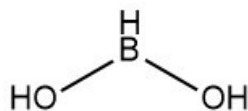
Terapie je založena na jaderné reakci (schéma reakce znázorněno v rovnici 1), která nastává po ozáření stabilního isotopu ¹⁰B neutrony s nízkou energií. Reakce poskytuje intenzivní ionizující záření α (částice ⁴He) a odstupující jádro ⁷Li ²⁵.



Aby léčba byla účinná, musí být k nádoru selektivně dodána optimální dávka ¹⁰B ^{12,26}. Jako zdroj neutronů se obvykle používá jaderný reaktor nebo urychlovač částic ²¹.

2.1.3.2 Ostatní

Velký význam zaznamenávají také sloučeniny odvozené od kyseliny boronové, jejíž struktura je znázorněna na obrázku 2. Kyselina boronová hraje velmi důležitou roli při syntéze biologicky aktivních sloučenin a zároveň může fungovat jako farmaceutické činidlo (enzymový inhibitor, činidlo pro BNCT, senzor sacharidů a další) ⁶.



Obrázek 2: Struktura kyseliny boronové

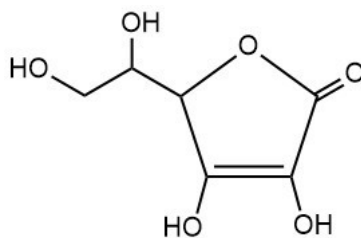
Uplatnění arylboronových kyselin jako cukerných senzorů je široké, jelikož jsou to malé a flexibilní molekuly, které mohou být snadno začleněny do větších struktur (např. proteinů), aniž by měnily jejich fyzikální vlastnosti. Velmi rychlá tvorba esterů kyseliny boronové s dioly ve vodném prostředí je ideální pro interakci s cukry. Vazba u těchto cyklických komplexů je reverzibilní, což je jejich nespornou výhodou. Interakce

kyseliny se sacharidy je značně komplikovanější než s obyčejnými dioly. Sacharidy jsou vlastně chirální polyoly, které existují v dynamické rovnováze mezi šestičlennou pyranosou a pětičlennou furanosou. Právě tvorba esterů může tuto rovnováhu mezi pětičlenným a šestičlenným kruhem měnit ⁶.

2.2 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová je ve vodě rozpustný vitamin s rozmanitými funkcemi v lidském těle. Hraje esenciální roli v hydroxylačních reakcích během syntézy kolagenu a karnitinu. Taktéž napomáhá vstřebávání železa do organismu a hraje významu roli při vychytávání volných radikálů. Je důležitou součástí antioxidačních ochranných mechanismů v buňkách a tkáních lidského těla ²⁷.

Kyselina askorbová (vitamin C) se strukturně řadí mezi cukerné kyseliny, γ -laktony a enedioly ²⁸, což je znázorněno na obrázku 3. Přilehlé hydroxylové skupiny postranního řetězce a *cis*-enediolové skupiny na pětičlenném kruhu jsou dostupné pro vytvoření vazby s dalšími ionty ¹⁸.



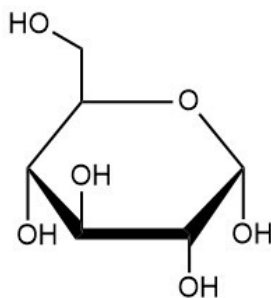
Obrázek 3: Strukturní vzorec kyseliny askorbové

2.3 Glukosa

Glukosa patří mezi monosacharidy a ve své přirozené podobě se vyskytuje například v ovoci, medu a jiných částech rostlin. Je to hlavní zdroj buněčné energie a zároveň majoritní volný cukr cirkulující v krevním oběhu u vyšších zvířecích organismů. Podílí se na mnoha významných biochemických dějích ^{29,30}

Glukosa sestává z šestičlenného uhlíkového skeletu a jedné aldehydové skupiny, proto se řadí mezi aldohexosy, což je znázorněno na obrázku 4. Molekula glukosy může zaujímat acyklickou (otevřenou) a cyklickou (kruhovou) podobu, u které vzniká tzv. hemiacetal. K zacyklení dochází v důsledku intramolekulární reakce aldehydového

uhlíku a hydroxylové skupiny na uhlíku 5. Ve vodném roztoku existuje jako směs obou forem a při pH = 7 je preferována forma cyklická ³⁰.



Obrázek 4: Strukturní podoba D-glukosy

Přibližně v 60. letech minulého století bylo objeveno, že volné cukry reagují s kyselinou boritou ve vodných roztocích, dokonce se podařilo izolovat několik alditolů a boronátů volných cukrů ²⁰.

2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně-chemická metoda, která slouží pro převedení molekul na ionty a následné rozdělení těchto iontů podle poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z). Na závěr jsou zaznamenávány relativní intenzity separovaných iontů.

Tato analytická metoda je velmi citlivá, destruktivní a spotřebovává minimální množství vzorku, což je velkou výhodou. Je klíčovou technikou pro kvalitativní chemickou analýzu.

2.4.1 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI) je jedna z nejvýznamnějších ionizačních technik pro hmotnostní spektrometrii. Je nejpoužívanější pro spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s MS. Tato jednoduchá technika, která pracuje při mírné teplotě a za atmosférického tlaku, se zároveň řadí mezi nejměkčí ionizační techniky dostupné pro MS ³¹.

Proces analýzy v ESI-MS můžeme rozčlenit do několika fází. Nejprve dochází k rozprašení roztoku vzorku do elektricky nabitých kapek (aerosolu), následně

k uvolňování iontů z kapek a transportu iontů z oblasti atmosférického tlaku (od zdroje ionizace) do oblasti vakua k analyzátoru.

Roztok vzorku putuje kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Ionizace kapaliny probíhá za atmosférického tlaku. Působením vysokého napětí je za podpory zmlžovacího plynu (N_2) na hrotu kapiláry vytvářen aerosol. Rozpouštědlo je z aerosolu postupně odpařováno, čímž dochází ke zvýšení povrchového náboje. Ve chvíli, kdy je elektrostatické odpuzování silnější než povrchové napětí, dojde k uvolnění nabitě kapičky, která následně putuje k opačné elektrodě ^{31,32}.

Roztok vstupující do iontového zdroje je obvykle směsí analytu s matricí (doprovodná složka vzorku), kvůli tomu vznikají kladně nebo záporně nabitě molekulární ionty (M^+ , M^-), adukty ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$), v některých případech i fragmenty ionizované molekuly (u méně stabilních látek) ³².

Ionizací elektrosprejem lze zpracovat rozmanité druhy analytů, které mají molekulovou hmotnost řádově od desítek Da až po tisíce kDa, např. anorganické ionty, ionizované polymery, nukleové kyseliny, peptidy a proteiny ³³.

2.4.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je poměrně rozšířenou technikou pro strukturní analýzy iontů a pro přímé analýzy komplexních směsí ³⁴. Velké využití nachází v toxikologii, novorozeneckém screeningu, biotechnologiích a farmaceutickém průmyslu ³⁵. Ve spojení s ionizací elektrosprejem je také velmi zajímavým nástrojem analýzy nederivatizovaných sacharidů ²⁴

Kolizí indukovaná disociace (CID) je jedna z hlavních analytických metod pro určení struktury sacharidů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie ³⁶. V analytických laboratořích zůstává CID nejčastěji používanou metodou aktivace iontů pro MS/MS ³⁷. Proces kolizí indukované disociace je velmi závislý na relativních hmotách neutrální molekuly a prekurzorového iontu ³⁷.

Když ion s vysokou translační energií podléhá neelastické srážce (kolizi) s neutrální částicí, část této energie je přeměněna na vnitřní energii iontu, což vede k následnému rozkladu a fragmentaci iontu ³⁷. Mezi hmotnostními analyzátory (obvykle 2 kvadrupóly) je umístěna kolizní cela, ve které dochází ke srážkám iontů. Prekurzorové ionty putují z prvního kvadrupólu do kolizní cely, kde se pod vlivem vyššího tlaku (přivádění kolizního plynu) a elektrického pole (urychlení iontů) srážejí s molekulami kolizního

plynu (dusík, argon). Takto vzniklé ionty (fragmenty) následně vstupují do druhého kvadrupólu ^{32,34}.

Kombinace jednotlivých typů analyzátorů je velmi populární a má řadu výhod. Často se setkáme se spojením dvou kvadrupólů (QqQ), kvadrupólu s průletovým analyzátozem (QqTOF), kvadrupólu s orbitrapem nebo iontové pasti s iontovou cyklotronovou rezonancí (IT-ICR). Velmi významné uplatnění mají tyto typy uspořádání ve spojení s měkkými ionzačními technikami ³².

3 Experimentální část

3.1 Seznam chemikálií

Chemikálie použité k přípravě komplexů jsou uvedeny v seznamu níže, dodavatelé jsou Sigma Aldrich (Gillingham, Dorset, UK), Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, ČR), PENTA s.r.o. (Praha, ČR) a Fisher Scientific (Loughborough, UK) – u jednotlivých látek jsou konkrétně uvedeny v závorce za chemikálií společně s čistotou látky.

- kyselina L-askorbová (99%, Sigma Aldrich)
- kyselina boritá (98%, Lach-Ner)
- glukosa bezvodá (96%, Sigma Aldrich)
- hydroxid sodný (98%, PENTA s.r.o.)
- acetonitril (čistota pro HPLC, Fisher Scientific)
- destilovaná voda

3.2 Přístroje a software

K navážení pevných látek bylo použito analytických vah Kern ALJ 220-4 (Kern & Sohn, Německo). Míchání roztoků komplexů bylo prováděno pomocí minitřepačky Stuart SA8 (Cole-Parmer, UK). K urychlení rozpouštění větších krystalků byla použita ultrazvuková lázeň Sonorex (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Německo). Hmotnostní spektra byla získána z hmotnostního spektrometru Bruker QqTOF compact (Bruker Daltonics, Německo). Jako sušící a rozprašující plyn byl použit dusík, který byl vytvořen generátorem dusíku MS-NGM 11 (Bruker Daltonics, Německo).

K ovládání hmotnostního spektrometru bylo využíváno programu Compass otofControl 4.0 (Build 60.11). Vyhodnocení spekter a následná identifikace komplexů byla provedena v softwarech Compass DataAnalysis 4.4 (Build 200.55.2969) a IsotopePattern (Bruker Daltonics, Německo).

K vytváření vzorců molekul, komplexů a ke znázornění fragmentačního schématu byly použity programy ChemDraw (verze: 16.0.1.4 (77), PerkinElmer, USA) a ACD/Chemsketch Freeware (verze: 2017.2.1, ACD Labs, Kanada). K dalšímu vyhodnocování byl použit program OriginPro 2015 (OriginLab, USA).

3.3 Postup

Pro přípravu komplexů boru s kyselinou askorbovou i glukosou bylo využito modifikovaného postupu z publikace³⁸.

Pro komplex $[B(AA)_2]^-$ bylo odváženo 12,4 mg kyseliny borité, následně smícháno s 70,4 mg kyseliny askorbové a rozpuštěno v 2 ml vody. K roztoku bylo poté přidáno 42 μ l hydroxidu sodného o koncentraci $4,75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Směs byla zahřívána na 60°C a současně míchána na magnetické míchačce po dobu jedné hodiny.

Poté bylo z roztoku odebráno 10 μ l aliquotu a naředěno 500 μ l acetonitrilu. Takto vzniklá směs byla opět promíchávána a zahřívána (tentokrát na 100°C) po dobu 2 hodin. Z roztoku bylo opět odebráno množství 10 μ l a $100\times$ zředěno acetonitrem. Následně byla proměřena hmotnostní spektra této směsi.

Pro druhý komplex s glukosou bylo opět smícháno požadované množství látek, tak aby byl zachován molární poměr kyselina boritá ku glukose 1:2. Bylo tedy naváženo 12,4 mg kyseliny borité a smícháno s 18,7 mg glukosy. Ke směsi byly, obdobně jako u prvního komplexu, přidány 2 ml vody a 42 μ l hydroxidu sodného. Roztok byl mísen na magnetické míchačce za laboratorní teploty po dobu 20 minut. Před vlastním měřením hmotnostních spekter byl roztok ještě $500\times$ naředěn acetonitrem.

Čerstvě připravené roztoky byly čiré a bezbarvé. Roztok s kyselinou askorbovou po 90 dnech změnil barvu na oranžovočervenou, ale zůstal čirý. Pravděpodobně došlo k degradaci kyseliny askorbové.

3.4 Podmínky měření

Všechna hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru qTOF compact za těchto podmínek:

- iontová polarita: negativní
- typ zdroje iontů: elektrosprej
- počátek skenování: 50 m/z
- konec skenování: 1 500 m/z
- tlak zmlžovače: 0,3 bar
- teplota sušicího plynu: 220°C
- průtok sušicího plynu: $3,0 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$.

Měření CID jednotlivých komplexů probíhalo za podmínek:

- šířka izolovaného pásu: 5 Da
- tlak kolizního plynu (N_2): $2,5 \cdot 10^{-3}$ mbar
- rozsah kolizní energie: 10–200 eV.

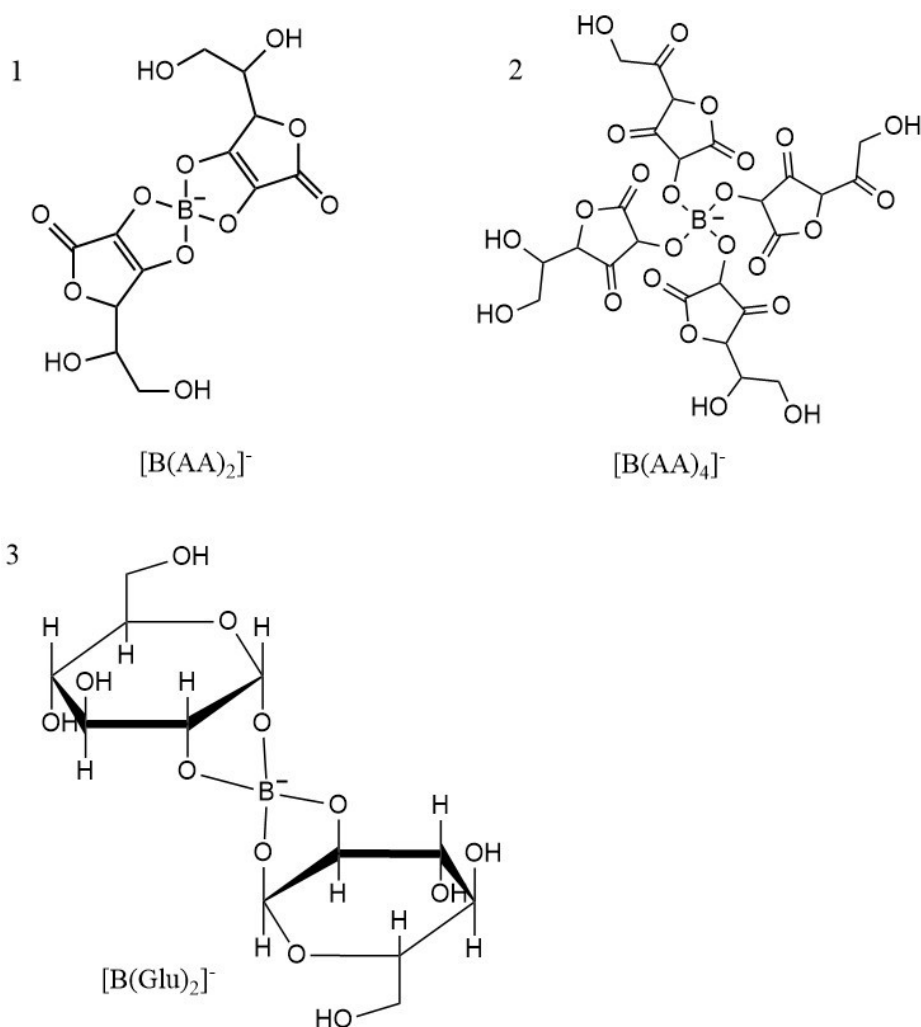
4 Výsledky a diskuze

Byly připraveny komplexy boru se dvěma cukernými ligandy a následně charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS).

Tabulka 1: Základní informace o komplexech boru s cukernými ligandy

kód	název	označení	sumární vzorec
TV01	bis [3,4-L-ascorbato]borate	$[B(AA)_2]^-$	$C_{12}H_{12}BO_{12}$
TV01	tetrakis [3-L-ascorbato]borate	$[B(AA)_4]^-$	$C_{24}H_{24}BO_{24}$
TV04	bis [β -D-glucopyranoside]borate	$[B(Glu)_2]^-$	$C_{12}H_{20}BO_{12}$

Strukturní vzorce jednotlivých charakterizovaných komplexů jsou uvedeny níže, na obrázku 4. Ve všech případech byla konstatována dobrá shoda experimentálně naměřených hodnot s hodnotami teoretickými.



Obrázek 5: Strukturní podoba jednotlivých komplexů boru s kyselinou askorbovou (1,2) a s glukosou (3)

Seznam připravených látek s naměřenými hmotnostně spektrometrickými daty je uveden v tabulce 2. Ve všech případech byla konstatována vynikající shoda experimentálně naměřených hodnot m/z s teoretickými hodnotami, přičemž chyba byla při všech měřeních menší než 1 ppm. Velmi dobrou shodu vykazovali i faktor $mSigma$ odrážející shodu naměřených izotopických profilů s vypočítanými.

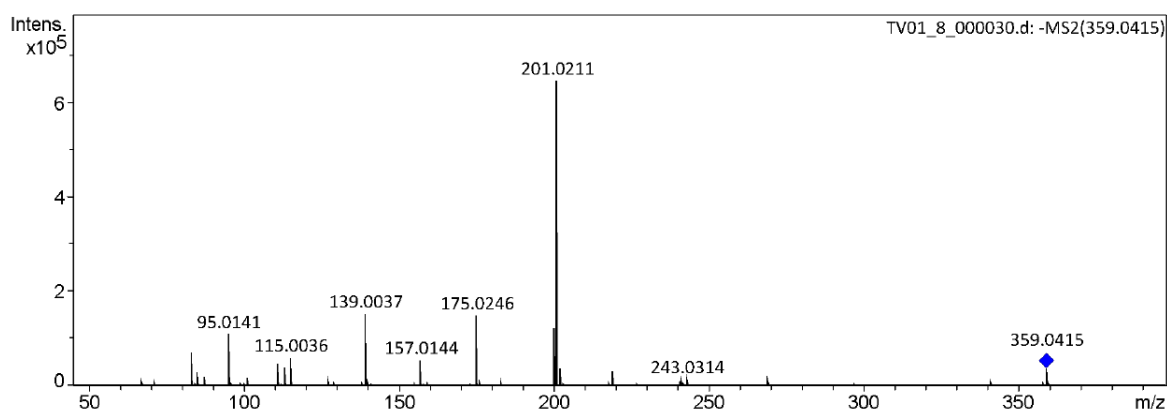
Tabulka 2: Charakterizace vzniklých komplexů pomocí HRMS

označení	měřená m/z	teoretická m/z	chyba $\Delta[\text{ppm}]$	chyba $\Delta[\text{mDa}]$	$mSigma$
$[\text{B}(\text{AA})_2]^-$	359,0433	359,0427	-1,0	-0,4	0,5
$[\text{B}(\text{AA})_4]^-$	707,0760	707,0756	0,1	0,1	4,9
$[\text{B}(\text{Glu})_2]^-$	367,1057	367,1053	-0,2	-0,4	3,9

S připravenými komplexy byly provedeny fragmentační experimenty v kolizní cele, kdy laboratorní kolizní energie CE byla postupně zvyšována po 1 eV v intervalu 10-200 eV. U všech iontů obsahujících bor byl registrován charakteristický izotopový profil odpovídající přirozenému zastoupení izotopů boru $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ v poměru 20%/80%. Tento charakteristický profil izotopů byl využit i pro identifikaci fragmentových iontů, a proto byly prekurní ionty izolovány v intervalu širokém 5 Da.

4.1 Komplex $[\text{B}(\text{AA})_2]^-$

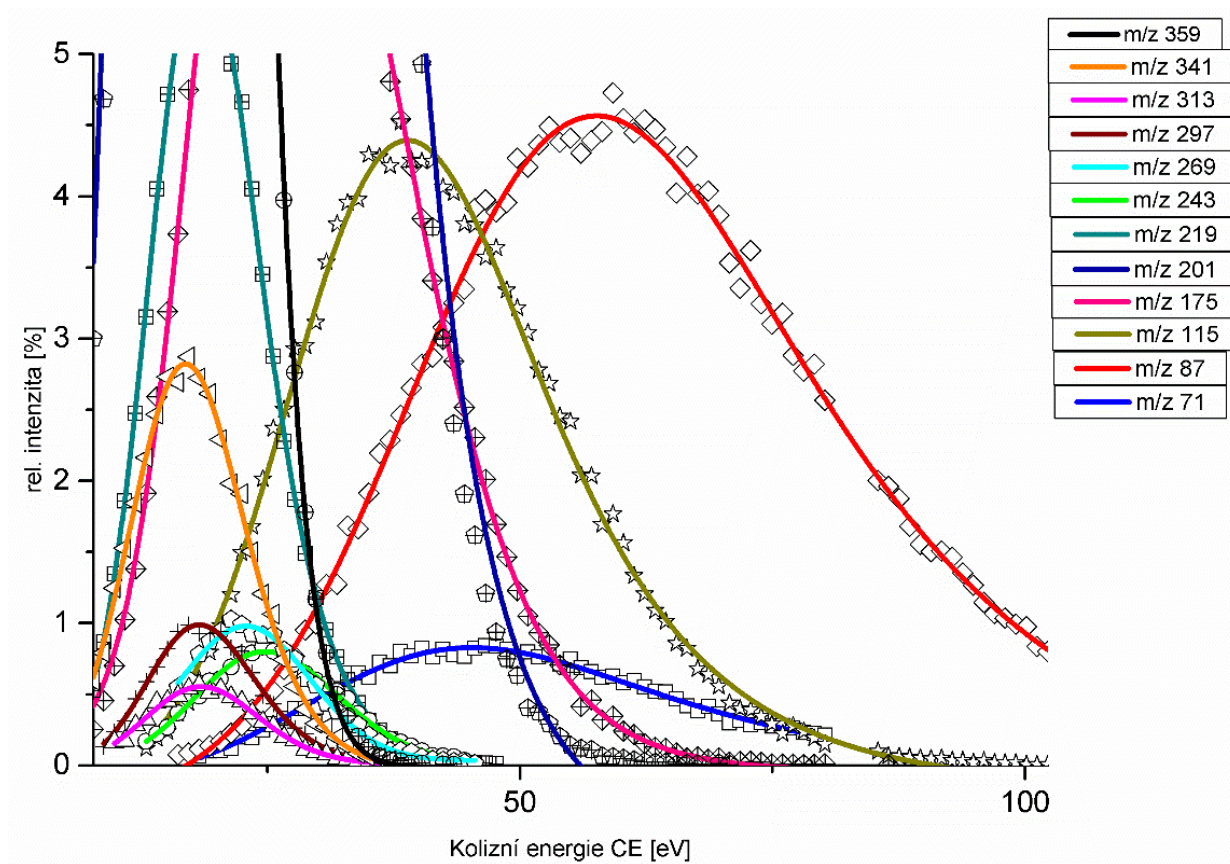
Na obrázku 5 je znázorněno MS/MS spektrum komplexu boru s kyselinou askorbovou při kolizní energii 30 eV. Ve spektru je označen výchozí molekulární ion m/z 359.



Obrázek 6: MS/MS spektrum komplexu boru s kyselinou askorbovou při kolizní energii CE 30 eV

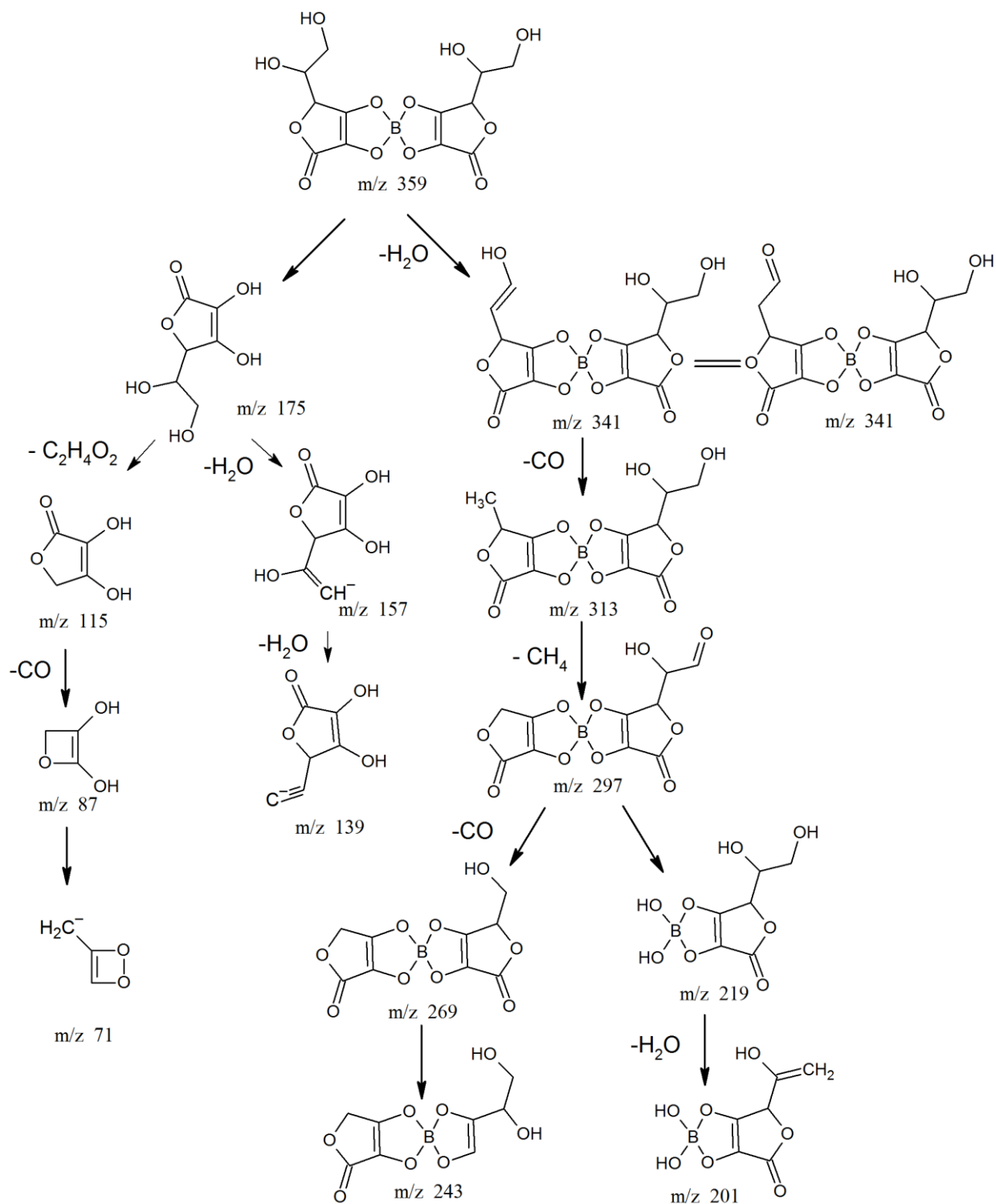
Ze spektra je patrné, že popis fragmentačních mechanismů představoval poměrně komplikovaný proces, který by se neobešel bez informací z kolizního diagramu,

zobrazeného na obrázku 6, a naměřených přesných hmot umožňujících identifikaci jednotlivých fragmentů.



Obrázek 7: Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací $[B(AA)_2]^-$ na kolizní energii CE

Následující schéma na obrázku 7 popisuje mechanismus fragmentace komplexu boru s dvěma askorbátovými ligandy.



Obrázek 8: Schéma fragmentace komplexu kyseliny borité s kyselinou askorbovou

Z navrženého schématu je zřejmé, že fragmentace probíhá ve dvou větvích. Větev na pravé straně představuje ionty, které obsahují bor jako centrální atom, a u kterých je rovněž možno pozorovat charakteristické rozložení izotopů boru. Fragmentace v tomto směru je zahájena ztrátou molekuly vody za vzniku iontu m/z 341, k čemuž dochází již za velmi nízké kolizní energie, a proto není tento ion ve spektru na obrázku 5 naměřeném při $CE = 30$ eV příliš patrný.

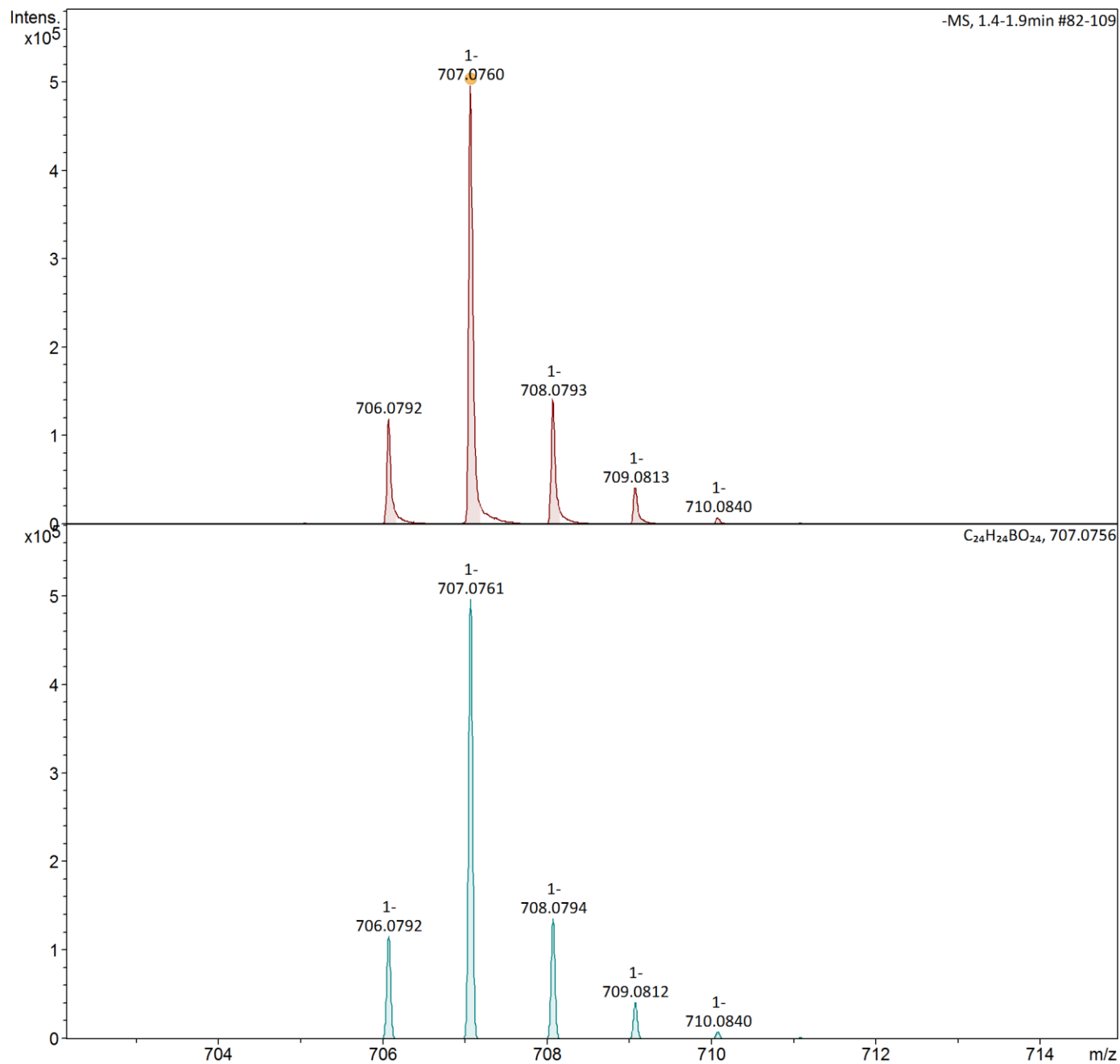
Fragmentačně zajímavá je potom následující ztráta oxidu uhelnatého (CO), za vzniku iontu m/z 313, vysvětlitelná pouze za přispění keto-enol tautomerie. Ztrátou methanu přechází tento ion na ion m/z 297, kde na základě studia CID diagramu dochází k dalšímu rozštěpení dané větve. První po ztrátě další molekuly oxidu uhelnatého končí na poměrně málo intenzivním píku m/z 243, zatímco druhá po ztrátě jednoho ligandu a následné eliminaci molekuly vody poskytuje nejintenzivnější ion m/z 201 ve spektru.

Fragmentační směr v levé větvi naznačuje po rozštěpení možnost migrace náboje na jeden z ligandů. Ionizovaná molekula kyseliny askorbové m/z 175 se potom fragmentuje opět dvěma možnými mechanismy. První směr je provízen opakovanou ztrátou molekuly vody za vzniku iontu m/z 139. Druhý směr, uplatňující se zejména při vysokých kolizních energiích, je reprezentován ztrátou ethendiolu a tvorbou iontu m/z 115, který po eliminaci molekuly oxidu uhelnatého poskytuje ion m/z 87 společně s iontem m/z 71.

4.2 Komplex $[B(AA)_4]^-$

V případě použití nadbytku ligandu (kyseliny askorbové) větším než čtyři ekvivalenty byl pozorován vznik komplexu boru se čtyřmi ligandy. Hmotnostní spektrum této látky je znázorněno na obrázku 8, kde je demonstrována shoda naměřeného izotopického profilu molekulárního iontu m/z 707 s vypočítaným izotopickým zastoupením pro látku s empirickým vzorcem $C_{24}H_{24}O_{24}B$, což právě odpovídá komplexu boru se čtyřmi

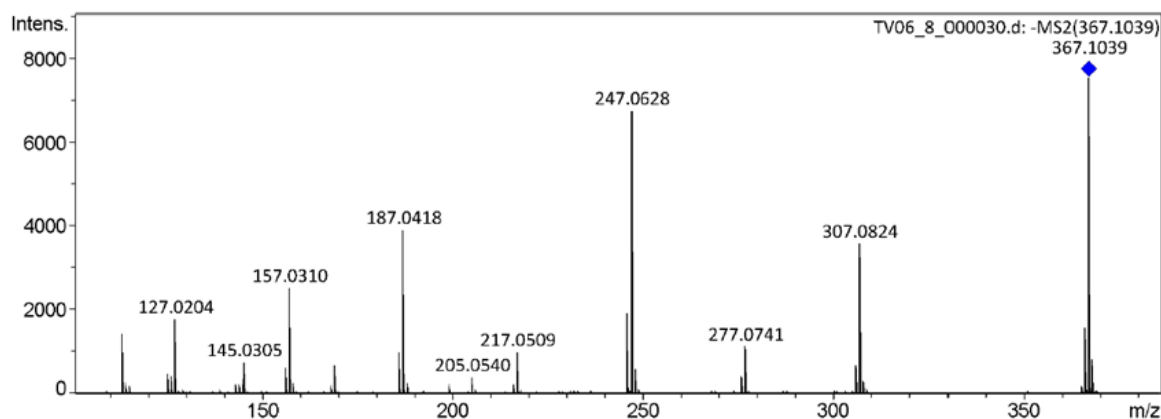
askorbátovými ligandy. Vznik tohoto komplexu také potvrzuje MS/MS spektrum, kde majoritní fragment m/z 549 vzniká odštěpením jednoho ligandu.



Obrázek 9: Hmotnostní spektrum komplexu $[B(AA)_4]^-$, shoda teoretické m/z s naměřenou m/z

4.3 Komplex [B(Glu)₂]⁻

V další části práce byl připraven a charakterizován pomocí HRMS komplexu boru s D-glukosou. MS/MS spektrum vzniklého komplexu s molekulárním iontem m/z 367 je zobrazeno na obrázku 10.



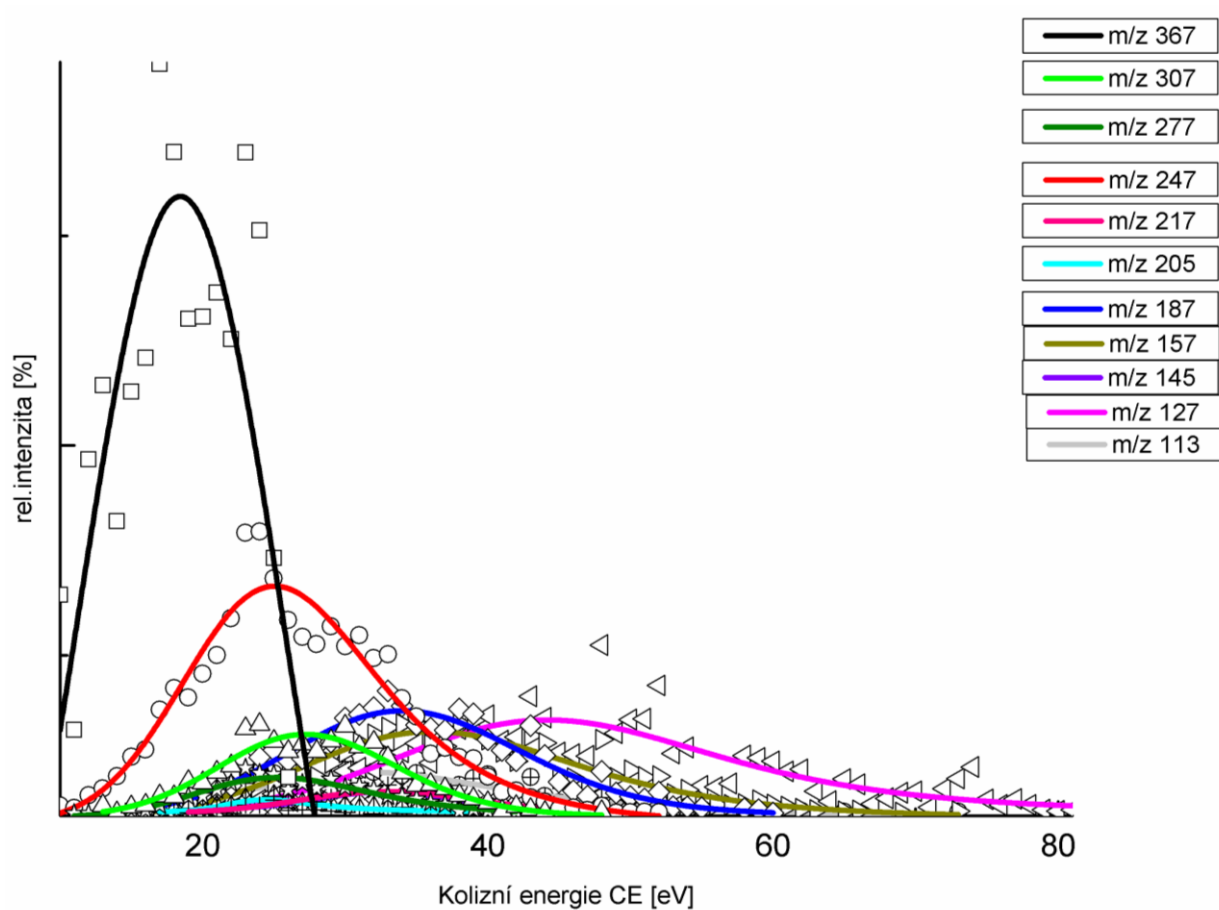
Obrázek 10: MS/MS spektrum komplexu boru s D-glukosou při kolizní energii 30 eV

Jak je ze spektra patrné, a jak také potvrzuje CID diagram na následujícím obrázku 10, je fragmentace díky přítomnosti cukerných ligandů relativně komplikovaná. Podrobnou interpretaci fragmentačního mechanismu shrnuje schéma na obrázku 11. Podle tohoto návrhu se fragmentace děje v podstatě do tří větví.

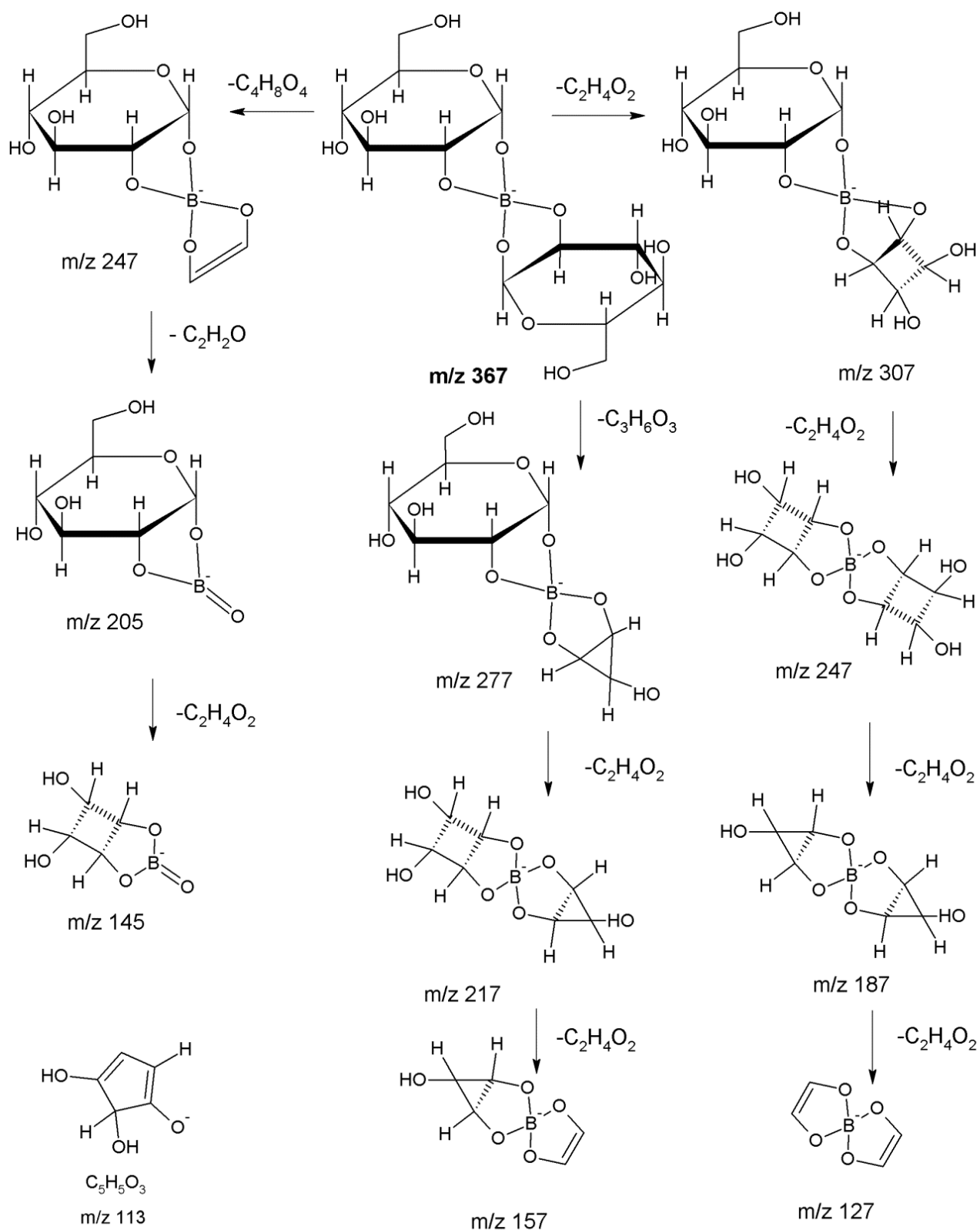
Pravá větev začíná ztrátou ethendiolu ($C_2H_4O_2$) z jednoho ligandu za vzniku iontu m/z 307, což se opakuje i u druhého ligandu, za poskytnutí iontu m/z 247. Tento mechanismus je ještě znovu zopakován, čímž vznikají ionty m/z 187 a následně m/z 127.

V prostřední větvi předchází opakované eliminaci ethendiolu ztráta $C_3H_6O_3$ za vzniku fragmentu m/z 227. Tato větev pokračuje dalšími dvěma fragmentacemi za ztráty 60 Da a vzniku iontů m/z 217 a m/z 157.

Levá větev po odštěpení $C_4H_8O_4$ poskytuje ion m/z 247, který je isomerní k již popsanému iontu z pravé větve. To je také jeden z důvodů vysoké intenzity tohoto píku ve spektru. Eliminací C_2H_2O vzniká ion m/z 205 a následnou ztrátou ethendiolu vzniká ion m/z 145. Ve všech dosud zmiňovaných iontech byl přítomen centrální atom boru, což je možné snadno identifikovat pomocí charakteristického izotopového profilu. Jediným pozorovaným iontem postrádajícím izotopy boru byl ion m/z 113. Elementární složení iontu m/z 113 je $C_5H_5O_3$ a vyplývá z měření přesné hmoty.



Obrázek 11: Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací $[B(Glu)_2]^-$ na kolizní energii CE



Obrázek 12: Schéma fragmentace komplexu boru s glukosou

5 Závěr

V této bakalářské práci se podařilo splnit zadané cíle. Byly úspěšně připraveny komplexy boru s kyselinou askorbovou a s glukosou, které byly následně charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokou rozlišovací schopností (HRMS). Při použití nadbytku kyseliny askorbové byl pozorován vznik komplexu se čtyřmi navázanými ligandy. Ve všech případech byla zjištěna výborná shoda experimentálních hodnot s teoretickými, jelikož chyba nepřesáhla 1 ppm.

Díky dalším experimentům, prováděným v kolizní cele (CID), se podařilo plně popsat fragmentační mechanismus komplexu boru se dvěma askorbátovými ligandy. U komplexu s glukosou se mechanismus fragmentace alespoň podařilo nastínit.

Další podrobné studium komplexů může vysvětlit jejich zajímavé vlastnosti a chování, a mohlo by tím naskytnout přesah do jiných oblastí, např. medicinských.

Seznam použité literatury

- (1) Bolaños, L.; Lukaszewski, K.; Bonilla, I.; Blevins, D. Why Boron? *Plant Physiol. Biochem.* **2004**, *42* (11), 907–912.
- (2) Köse, D. A.; Zümreoglu-Karan, B. Complexation of Boric Acid with Vitamin C. *New J. Chem.* **2009**, *33* (9), 1874.
- (3) Ricardo, A., Carrigan, M. A., Olcott, A. N., & Benner, S. A. Borate Minerals Stabilize Ribose. *Science* (80-.). **2004**, *303* (5655), 196.
- (4) Bonilla, L.; Garcia-Gonzalez, M.; Mateo, P. Boron Requirement in Cyanobacterial Its Possible Role in the Early Evolution of Photosynthetic Organisms. *Plant Physiol* **1990**, *94*, 560.
- (5) Bolanos, L.; Redondo-Nieto, M.; Bonilla, I.; Wall, L. G. Boron Requirement in the Discaria Trinervis (Rhamnaceae) and Frankia Symbiotic Relationship. Its Essentiality for Frankia BCU110501 Growth and Nitrogen Fixation. *Physiol. Plant.* **2002**, *115* (4), 563–570.
- (6) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. Boronic Acid Compounds as Potential Pharmaceutical Agents. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23* (3), 346–368.
- (7) Köse, D.; Zümreoglu-Karan, B. Mixed-Ligand Complexes of Boric Acid with Organic Biomolecules. *Chem. Pap.* **2012**, *66* (1).
- (8) 2. Sloučeniny boru
<https://is.muni.cz/el/1431/podzim2008/C1441/publikace/ch05s02.html#H3BO3>
(accessed May 21, 2018).
- (9) PubChem. Boric acid <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7628>
(accessed May 21, 2018).
- (10) Duggan, P. J.; Tyndall, E. M. Boron Acids as Protective Agents and Catalysts in Synthesis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, *0* (11), 1325–1339.
- (11) Ralston, N. V. .; Hunt, C. D. Diadenosine Phosphates and S-Adenosylmethionine: Novel Boron Binding Biomolecules Detected by Capillary Electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2001**, *1527* (1–2), 20–30.
- (12) Thellier, M.; Chevallier, A.; His, I.; Jarvis, M. C.; Lovell, M. A.; Ripoll, C.; Robertson, D.; Sauerwein, W.; Verdus, M.-C. Methodological Developments For Application To The Study Of Physiological Boron And To Boron Neutron Capture Therapy. *J. Trace Microprobe Tech.* **2001**, *19* (4), 623–657.

- (13) Heilbron, I.; Jones, E. R. H.; Sondheimer, F. 129. Researches on Acetylenic Compounds. Part XV. The Oxidation of Primary Acetylenic Carbinols and Glycols. *J. Chem. Soc.* **1949**, 604.
- (14) Shapiro, I.; Wilson, C. O.; Ditter, J. F.; Lehmann, W. J. Mass Spectrometry in Boron Chemistry; 1961; pp 127–138.
- (15) Sah, R. N.; Brown, P. H. Boron Determination—A Review of Analytical Methods. *Microchem. J.* **1997**, 56 (3), 285–304.
- (16) Sah, R. N.; Brown, P. H. Techniques for Boron Determination and Their Application to the Analysis of Plant and Soil Samples. *Plant and Soil*. Springer pp 15–33.
- (17) Pizer, R. D.; Tihal, C. A. Mechanism of Boron Acid/Polyol Complex Formation. Comments on the Trigonal/Tetrahedral Interconversion on Boron. *Polyhedron* **1996**, 15 (19), 3411–3416.
- (18) Icten, O.; Hosmane, N. S.; Kose, D. A.; Zumreoglu-Karan, B. Magnetic Nanocomposites of Boron and Vitamin C. *New J. Chem.* **2017**, 41 (9), 3646–3652.
- (19) Bishop, M.; Bott, S. G.; Barron, A. R. Structural Characterization of Borate Esters in Which Sodium Acts as a Support to the Structural Framework. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **2000**, 0 (18), 3100–3105.
- (20) Ferrier, R. J. Carbohydrate Boronates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, 35, 31–80.
- (21) Shull, B. K.; Spielvogel, D. E.; Head, G.; Gopaldaswamy, R.; Sankar, S.; Devito, K. Studies on the Structure of the Complex of the Boron Neutron Capture Therapy Drug, L-p-Boronophenylalanine, with Fructose and Related Carbohydrates: Chemical and ¹³C NMR Evidence for the β-D-Fructofuranose 2,3,6-(p-Phenylalanylorthoboronate) Structure. *J. Pharm. Sci.* **2000**, 89 (2), 215.
- (22) Power, P. P.; Woods, W. G. The Chemistry of Boron and Its Speciation in Plants. *Plant Soil* **1997**, 193 (2), 1–13.
- (23) Pappin, B.; J., M.; A., T. Boron-Carbohydrate Interactions. In *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*; InTech, 2012.
- (24) Thacker, J. B.; Schug, K. A. Effects of Solvent Parameters on the Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Response of Glucose. *Rapid Commun.*

- Mass Spectrom.* **2018**, 32 (15), 1191–1198.
- (25) Mehta, S. C.; Lu, D. R. Targeted Drug Delivery for Boron Neutron Capture Therapy. *Pharm. Res.* **1996**, 13 (3), 344–351.
 - (26) Barth, R. F.; Zhang, Z.; Liu, T. A Realistic Appraisal of Boron Neutron Capture Therapy as a Cancer Treatment Modality. *Cancer Commun.* **2018**, 38 (1), 36.
 - (27) Bendich, A.; Machlin, L. J.; Scandurra, O.; Burton, G. W.; Wayner, D. D. M. The Antioxidant Role of Vitamin C. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* **1986**, 2 (2), 419–444.
 - (28) Zümreoglu-Karan, B. The Coordination Chemistry of Vitamin C: An Overview. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250 (17–18), 2295–2307.
 - (29) The Editors of Encyclopaedia Britannica. Glucose | Definition, Structure, & Function | Britannica.com <https://www.britannica.com/science/glucose> (accessed Jul 11, 2018).
 - (30) Pubchem. D-Glucose <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-glucose#section=Top> (accessed Jul 13, 2018).
 - (31) Bruins, A. P. Mechanistic Aspects of Electrospray Ionization. *J. Chromatogr. A* **1998**, 794 (1–2), 345–357.
 - (32) Friedecký D; Lemr K. *Úvod Do Hmotnostní Spektrometrie*; 2012; Vol. 20.
 - (33) Kebarle, P.; Verkerk, U. H. Electrospray: From Ions In Solution To Ions In The Gas Phase, What We Know Now. **2009**.
 - (34) Douglas, D. J. Applications of Collision Dynamics in Quadrupole Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9 (2), 101–113.
 - (35) Mittal, R. D. Tandem Mass Spectroscopy in Diagnosis and Clinical Research. *Indian J. Clin. Biochem.* **2015**, 30 (2), 121–123.
 - (36) Jien-Lian Chen, a Hock Seng Nguan, a Po-Jen Hsu, a Shang-Ting Tsai, A.; Chia Yen Liew, a Jer-Lai Kuo, a W.-P. H. b and C.-K. N. Collision-Induced Dissociation of Sodiased Glucose and Identification of Anomeric Configuration. *R. Soc. Chem.* **2017**.
 - (37) Sleno, L.; Volmer, D. A. Ion Activation Methods for Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, 39 (10), 1091–1112.
 - (38) Geier, M. J.; Bowes, E. G.; Lee, G. M.; Li, H.; O'Neill, T.; Flewelling, A.; Vogels, C. M.; Decken, A.; Gray, C. A.; Westcott, S. A. Synthesis and Biological

Activities of Arylspiroborates Derived from 2,3-Dihydroxynaphthalene.
Heteroat. Chem. **2013**, 24 (2), 116–123.